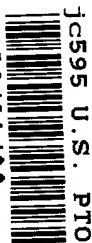
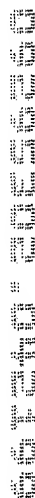


04/21/99



JC595 U.S. PTO



PTO/SB/05 (2/99)

Approved for use through 09/30/2000. OMB 0651-0032
Patent and Trademark Office: U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

JC649 U.S. PTO

09/295302



04/21/99

**UTILITY
PATENT APPLICATION
TRANSMITTAL**

(Only for new nonprovisional applications under 37 CFR § 1.53(b))

Attorney Docket No. 000007.00148

First Inventor or
Application Identifier Karlheinz SchmidtTitle: Agent for the Manufacture of Biological Parts Including an
Active Ingredient Complex and Carrying Materials Suitable for the
Active Ingredient ComplexExpress Mail Label
No.**APPLICATION ELEMENTS**

See MPEP chapter 600 concerning utility patent application contents.

ADDRESS TO: Assistant Commissioner for Patents
Box Patent Application
Washington, DC 20231

1. ☒ Fee Transmittal Form (e.g., PTO/SB/17)
(Submit an original, and a duplicate for fee processing)
2. ☒ Specification [Total Pages 20]
(preferred arrangement set forth below)
 - Descriptive title of the invention
 - Cross References to Related Applications
 - Statement Regarding Fed sponsored R&D
 - Reference to Microfiche Appendix
 - Background of the Invention
 - Brief Summary of the Invention
 - Brief Description of the Drawings (if filed)
 - Detailed Description
 - Claim(s)
 - Abstract of the Disclosure
3. ☒ Drawing(s) (35 USC 113) [Total Sheets 2]
4. Oath or Declaration [Total Pages]
 - a. **UNEXECUTED** (original or copy)
 - b. ☐ Copy from a prior application (37 CFR 1.63(d))
(for continuation/divisional with Box 17 completed)
[Note Box 5 below]
 - i. ☐ **DELETION OF INVENTOR(S)**
Signed statement attached deleting
inventor(s) named in the prior application, see
37 CFR 1.63(d)(2) and 1.33(b).
5. ☐ Incorporation By Reference (useable if Box 4b is checked)
The entire disclosure of the prior application, from
which a copy of the oath or declaration is supplied
under Box 4b, is considered as being part of the
disclosure of the accompanying application and is
hereby incorporated by reference therein.

6. ☐ Microfiche Computer Program (Appendix)
7. Nucleotide and/or Amino Acid Sequence Submission
(if applicable, all necessary)
 - a. ☐ Computer Readable Copy
 - b. ☐ Paper Copy (identical to computer copy)
 - c. ☐ Statement verifying identity or above copy

ACCOMPANYING APPLICATION PARTS

8. ☐ Assignment Paper (cover sheet & document(s))
9. ☐ 37 CFR 3.73(b) Statement ☐ Power of Attorney
(when there is an assignee)
10. ☐ English Translation Document (if applicable)
11. ☐ Information Disclosure Statement (IDS)/PTO-1449 ☐ Copies of IDS Citations
12. ☒ Preliminary Amendment
13. ☒ Return Receipt Postcard (MPEP 503)
(should be specifically itemized)
14. ☐ *Small Entity ☒ Statement filed in prior application.
Statement(s) Status still proper and desired
(PTO/SB/09-12)
15. ☐ Certified Copy of Priority Document(s)
(if foreign priority is claimed)
16. ☐ Other:

*NOTE FOR ITEMS 1 & 14: IN ORDER TO BE ENTITLED TO PAY SMALL
ENTITY FEES, A SMALL ENTITY STATEMENT IS REQUIRED (37 C.F.R. §
1.27), EXCEPT IF ONE FILED IN A PRIOR APPLICATION IS RELIED UPON

17. If a CONTINUING APPLICATION, check appropriate box and supply the requisite information:

☐ Continuation ☐ Divisional ☒ Continuation-in-part (CIP) of prior application No.: 08 / 899,270
Prior application information: Examiner P. Delaney Group/Art Unit: 1654**18. CORRESPONDENCE ADDRESS**☒ Customer Number or Bar Code Label 002779 or ☐ Correspondence address below
(insert Customer No. or Attach bar code label here)

NAME	Herbert Cohen, Esq.				
ADDRESS	BLANK ROME COMISKY & McCAULEY LLP				
	900 17 TH STREET, N.W., SUITE 1000				
CITY	WASHINGTON	STATE	D.C.	ZIP CODE	20006
COUNTRY	U.S.	TELEPHONE	(202) 463-7700	FACSIMILE	(202) 463-6915

Name (Print/Type)	Herbert Cohen	Registration No. (Attorney/Agent)	25,109
Signature		Date	April 21, 1999

Burden Hour Statement: This form is estimated to take 0.2 hours to complete. Time will vary depending upon the needs of the individual case. Any comments on the amount of time you are required to complete this form should be sent to the Chief Information Officer, Patent and Trademark Office, Washington, DC 20231. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Assistant Commissioner for Patents, Box Patent Application, Washington, DC 20231

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Honorable Commissioner of Patents and Trademarks
Washington, D. C. 20231

Atty. Docket No. 0007.148

Sir:

TRANSMITTED HERewith FOR FILING IS A PATENT APPLICATION:

OF: Karlheinz SCHMIDT

For: AGENT FOR THE MANUFACTURE OF BIOLOGICAL PARTS INCLUDING AN ACTIVE INGREDIENT COMPLEX AND CARRYING MATERIALS SUITABLE FOR THE ACTIVE INGREDIENT COMPLEX

1. ☒ Specification of 19 pages. 1a. ☐ Foreign Language
2. ☒ Claims, 7 in number.
3. ☒ Abstract.
4. ☒ Drawings. ☒ formal ☐ informal 2 sheets ☐ no drawings.
5. ☒ Filing Fee. (See (12) below).
6. ☐ Declaration **UNSIGNED** by the named inventor(s).
7. ☒ A verified statement to establish small entity status has been filed in the parent application.
8. ☐ An assignment to _____.
9. ☐ A certified copy of (a) _____ application(s),
 Serial No(s). _____,
 filed _____,
 the priority of which is hereby claimed.
10. ☒ Preliminary Amendment.
11. ☐ Other:

The filing fee is calculated below:

FOR	No. Filed	Basic	No. Extra	Rate \$	Calculations
Total Claims	7	20	0	\$ 18.00	\$0
Indep. Claims	1	3	0	\$ 78.00	\$0
<input checked="" type="checkbox"/> Multiple Dependent Claims				\$260.00	\$260.00
BASIC FEE					\$760.00
TOTAL OF ABOVE CALCULATIONS					\$1,020.00
<input checked="" type="checkbox"/> Reduction by 1/2 For Filing By Small Entity					\$510.00
TOTAL FILING FEE					\$510.00
<input type="checkbox"/> Fee For Recording of Assignment (\$40.00)					\$0
TOTAL OF FILING AND ASSIGNMENT RECORDING FEES					\$510.00

☒ The Commissioner is authorized to charge this fee or any additional fee due in connection with this communication to Deposit Account No. 23-2185 (0007.148). **A duplicate copy of this sheet is enclosed.**

☒ In the event that a petition for an extension of time is required to be submitted herewith, and in the event that a separate petition does not accompany this response, applicant(s) hereby petition(s) under 37 CFR 1.136(a) for an extension of time for as many months as are required to render this submission timely. Any fee due is authorized above.

Respectfully submitted,

By: _____

Herbert Cohen
Registration No. 25,109

Date: April 21, 1999

BLANK ROME COMISKY & McCAULEY LLP
900 17th Street, N.W., Suite 1000
Washington, D.C. 20006
(202) 463-7700 (Telephone)
(202) 463-6915 (Facsimile)

JC649 U.S. PTO
09/295302
04/21/99

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re CIP Application of Application)
Serial No. 08/899,270, filed July 23, 1997) Attn: APPLICATION BRANCH
Karlheinz SCHMIDT)
Serial No.: Unassigned) Atty. Dkt. No. 0007.148/P143
Filed: April 21, 1999) HC:KN:dhw
For: AGENT FOR THE MANUFACTURE)
OF BIOLOGICAL PARTS INCLUDING)
AN ACTIVE INGREDIENT COMPLEX)
AND CARRYING MATERIALS)
SUITABLE FOR THE ACTIVE)
INGREDIENT COMPLEX) April 21, 1999

PRELIMINARY AMENDMENT

Hon. Commissioner of Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20036

Sir:

Preliminary to examination of the above-identified application, please amend the application as follows:

IN THE SPECIFICATION:

On page 1, lines 17, please insert --This is a continuation-in-part of application Serial No. 08/899,270, filed July 23, 1997, which was a FWC of application Serial No. 08/313,113, filed December 7, 1994, which claims priority of Serial No. 07/849,083, filed September 17, 1992, which claims priority of German Patent No. WO 91/07324 and this is a continuation-in-part of Serial No. 350,666, filed December 7, 1994, which claims priority from Serial No. 08/474,150, filed July 7, 1995, which claims priority from

U.S. Patent No. 5,830,859, issued November 3, 1998 all of which are herein incorporated by reference.

On page 17, line 27, please insert --Although certain presently preferred embodiments of the present invention have been specifically described herein, it will be apparent to those skilled in the art to which the invention pertains that variations and modifications of the various embodiments shown and described herein may be made without departing from the spirit and scope of the invention. Accordingly, it is intended that the invention be limited only to the extent required by the appended claims and the applicable rules of law.--.

REMARKS

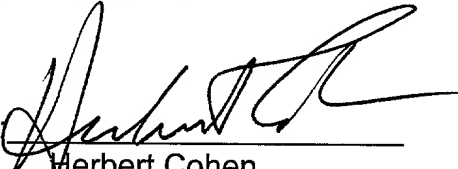
In the event there are any questions relating to this Preliminary Amendment or to the application in general, it would be appreciated if the Examiner would telephone the undersigned attorney concerning such questions so that the prosecution of this application may be expedited.

Please charge any shortage or credit any overpayment of fees to BLANK ROME COMISKY & MCCAULEY LLP, Deposit Account No. 23-2185 (0007.148/P). In the event that a petition for an extension of time is required to be submitted herewith and in the event that a separate petition does not accompany this response, Applicant hereby

petitions under 37 C.F.R. §1.136(a) for an extension of time for as many months as are required to render this submission timely. Any fee due is authorized above.

Respectfully submitted,

Karlheinz Schmidt

By 
Herbert Cohen
Registration No. 25,109

BLANK ROME COMISKY & MCCAULEY LLP
900 17th Street, NW, Suite 1000
Washington, D.C. 20006
Phone: (202) 463-7700
Facsimile: (202) 463-6915

tms/03.04/P

16. April 1999

5

Prof. Dr. Dr. K.H. Schmidt**Äußere Weiler Str. 12****72810 Gomaringen**

10

**Mittel für die Herstellung biologischer Teile mit einem Wirkstoffkomplex
und für diesen geeigneten Trägermaterialien**

15

20

25

Die Erfindung betrifft ein Mittel für die zumindest teilweise Herstellung oder Wiederherstellung von biologischen Teilen, insbesondere von Organen für Lebewesen, das unter anderem einen Wirkstoffkomplex aufweist, mit den folgenden, voneinander unterschiedlichen und auf das jeweils herzustellende biologische Teil spezifisch abgestimmten Komponenten in Form mindestens einer Strukturkomponente auf der Basis von auf die Zellen des jeweils herzustellenden biologischen Teils spezifisch abgestimmtem extrazellulärem Material, mindestens einer Rekrutierungskomponente, mindestens einer Adhäsionskomponente und mindestens einer Wachstums- und/oder Maturationskomponente.

30

Im Stand der Technik ist bereits ein Wirkstoffkomplex für die Herstellung von biologischen Teilen, insbesondere von Organen für Lebewesen, mit den genannten Komponenten bekannt. Bei diesem bekannten Wirkstoffkomplex kann die Strukturkomponente beispielsweise aus verschiedenen Collagenen, Elastin oder Proteoglycanen bestehen. Als Rekrutierungskomponente für diesen Wirkstoffkomplex

sind insbesondere Chemotaktica zu nennen, beispielsweise Peptide, wie N-F-Met-Leu-Phe- und/oder beispielsweise Metabolite der Arachidonsäure, wie Leukotriene. Die Aufgabe der Adhäsionskomponente können Eiweißkörper vom Typ des Fibronectins oder Laminins, aber auch Zell-Adhäsions-Moleküle, wie L-CAM, N-CAM und Matrix-Adhäsions-Moleküle, wie Cytotactin, Tenascin, Collagen Typ IV, V, VII, synthetische Peptide und Transmembran-Verbindungsproteine, wie Integrin, erfüllen. Die zunächst genannten Beispiele für Adhäsionskomponenten, Fibronectin und Laminin, sind für die Zwecke des hier erläuterten Wirkstoffkomplexes in den Bereich der Matrix-Adhäsions-Moleküle einzuordnen. Als weitere Komponente weist der genannte Wirkstoffkomplex mindestens eine Wachstums- und/oder Maturationskomponente auf, vorzugsweise in Form eines oder mehrerer Cytokine. Beispiele für solche Cytokine sind bei der Herstellung von Blut die Kolonie-stimulierenden Faktoren, bei der Herstellung von Bindegewebe der Fibroblasten Wachstumsfaktor, bei der Herstellung von Haut der epidermale Wachstumsfaktor, bei der Herstellung von Knorpel der Knorpel induzierende Faktor, bei der Herstellung der Milz oder der Lymphknoten der Lymphocyten aktivierende Faktor sowie Milzpeptide, für die Herstellung von Thymus der T-Zellen Wachstumsfaktor sowie Thymuspeptide, für die Herstellung von Knochen der Knochen-Wachstumsfaktor sowie der transformierende Wachstumsfaktor, für die Herstellung von Blutgefäßen der Angiogenese-Faktor. Ferner finden noch die folgenden Cytokine Verwendung: Interleukine, Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren, der Tumor-Nekrose-Faktor, Prostaglandine, Leukotriene, transformierende Wachstumsfaktoren, von Thrombocyten abstammender Wachstumsfaktor, Interferone sowie von Endothelzellen abstammender Wachstumsfaktor.

Näheres über diesen Wirkstoffkomplex ist aus dem deutschen Patent DE 39 36 568.9 zu entnehmen, dessen Offenbarungsgehalt hier ausdrücklich einbezogen wird.

Um für die Herstellung oder Wiederherstellung von biologischen Teilen verwendet werden zu können, muß dieser Wirkstoffkomplex höchstrein vorliegen. Die Herstellung dieses Wirkstoffkomplexes ist daher sowohl zeitintensiv als auch kostspielig.

lig. Um z. B. Knochendefekte mittels dieses Wirkstoffkomplexes wieder mit Knochen aufzufüllen, bedarf es einer den gesamten Knochendefekt ausfüllenden Menge des Wirkstoffkomplexes. Es ist daher nachteilig, daß der Wirkstoffkomplex zwar höchstwirksam, seine Anwendung jedoch sehr teuer ist.

5

Wenn größere Knochendefekte auszufüllen sind, muß das eingebrachte Implantat, bestehend aus dem Wirkstoffkomplex außerdem eine ausreichende Eigenfestigkeit haben, um durch die umgebenden Weichgewebe nicht komprimiert zu werden. Der Wirkstoffkomplex hat nach seiner Herstellung zunächst eine watteartige Konsistenz. Er muß daher für die genannte Anwendung entweder komprimiert werden, was zu einer höheren mechanischen Festigkeit, aber auch zu einem hohen Materialverbrauch führt, oder es muß ein ausreichend stabiles Trägermaterial zusammen mit dem Wirkstoffkomplex eingesetzt werden. Die Kombination eines Trägermaterials mit dem Wirkstoffkomplex ist jedoch keinesfalls unproblematisch. Nach den bisher zur Verfügung stehenden Erkenntnissen über den Wirkstoffkomplex und seine komplexe Wirkungsweise ist zumindest eine Beeinträchtigung der Bildung oder Wiederherstellung des jeweiligen zu behandelnden biologischen Teils, z. B. der knöchernen Regeneration, zu befürchten. Auch die Gefahr einer gewebe-toxischen Reaktion wurde vermutet.

Außerdem sind Anwendungen des Wirkstoffkomplexes bei Krankheiten oder Defekten bisher nicht möglich, bei denen das aus dem Wirkstoffkomplex bestehende Implantat so hohen mechanischen Belastungen ausgesetzt wird, daß auch die mechanische Festigkeit eines komprimierten Materials nicht ausreichen kann.

10

15

20

25

30

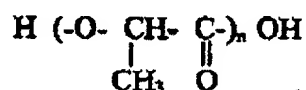
Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Mittel, bei dem ein Träger mit dem genannten Wirkstoffkomplex beschichtet ist oder den Wirkstoffkomplex aufweist.

Die Lösung der Aufgabe lag schon deshalb nicht nahe, weil es, wie bereits erläutert, durchaus problematisch ist, eine Kombination des Wirkstoffkomplexes mit einem Träger, mit dem der Wirkstoffkomplex beschichtet ist oder den er aufweist, vorzusehen, weil dann die Einheilung des Wirkstoffkomplexes, beispielsweise in den Knochendefekt gestört sein oder zumindest durch mögliche Immunreaktionen kompliziert werden könnte.

An mögliche Trägermaterialien werden bestimmte Anforderungen gestellt. Es können grundsätzlich als Trägermaterialien solche verwendet werden, die formbar sind und zumindest zu Beginn eine gewünschte Form- und Dimensionsstabilität aufweisen, wobei sich nach der Implantierung im Organismus ein kontrollierter Form- und Härteverlust ergeben kann. Für bestimmte Anwendungen müssen sie außerdem komplett resorbierbar sein und grundsätzlich dürfen sie nur eine geringe Toxizität aufweisen. Dies gilt nicht nur für das Trägermaterial selbst, sondern auch für dessen Abbauprodukte. Dabei ist unter dem Begriff der Toxizität nicht nur eine akute toxische Gewebereaktion zu verstehen, sondern es müssen auch subakute Wirkungen, wie z. B. karzinogene und immunologische Effekte einbezogen werden.

Der erfindungsgemäß mit dem Wirkstoffkomplex kombinierte Träger kann aus polymeren, keramischen, metallischen oder nichtmetallischen Trägermaterialien bestehen. Bei den polymeren Trägermaterialien kommen insbesondere Polymere aus natürlichen Monomeren, wie Polyaminosäuren (Polylysin), Polyglutaminsäure, etc.) und Polymere der Milchsäure in Betracht. Es können auch Copolymere z. B. aus Polymilchsäure und Hydroxyessigsäure verwendet werden.

Polylaktate sind Polyester der Milchsäure mit der chemischen Formel:



Bei der direkten Polymerisation der Monomere ergeben sich Polymere mit relativ niedrigen Molekulargewichten. Die obere Grenze liegt etwa bei 20000 Da. Höhere Molekulargewichte können durch die Verknüpfung zyklischer Dimere bei hoher

Temperatur, geringem Druck und in Gegenwart von Katalysatoren entstehen. Die Milchsäurepolymere sind bioabbaubar, biokompatibel, wasserunlöslich und zeichnen sich durch eine große Festigkeit aus.

5 Des weiteren können verschiedene Collagene als Trägermaterial verwendet werden. Hierbei sind insbesondere die Collagene vom Typ I, IV, V, VII zu nennen. Die Collagene können beispielsweise in Form von Vliesen oder Gelen eingesetzt werden und weisen insbesondere eine an sich gute immunologische Verträglichkeit in Verbindung mit einer problemlosen Verarbeitung auf.

10

Unter den keramischen Trägermaterialien sind insbesondere Glaskeramiken zu nennen, insbesondere Calciumphosphatkeramiken, Aluminiumoxidkeramiken und Hydroxylapatitkeramiken.

15 Die Calciumphosphatkeramiken basieren auf dem System $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$. Auf der Basis dieses Systems existieren fünf verschiedene binäre Verbindungen. Dabei haben sich Tricalciumphosphat (TCP) und Tetracalciumphosphat für die Zwecke der vorliegenden Erfindung als ein geeignetes Trägermaterial erwiesen.

20 TCP wird durch Pressen und anschließendes Sintern der Ausgangsmaterialien Calciumoxid (CaO) und Diphosphorpentoxid (P_2O_5) hergestellt. Alternativ kann es auch in einem Arbeitsschritt durch Heißpressen hergestellt werden. Aus TCP hergestellte Trägermaterialien können in Form von Platten oder Scheiben und als Granulat eingesetzt werden.

25

Tetracalciumphosphat wird ähnlich wie TCP in zwei Schritten hergestellt, indem zunächst die Ausgangsstoffe auf Kristallgitterabstände von 5 bis 10 μm verdichtet und die Masse dann bei 1100 bis 1500°C gebrannt wird.

30 Hydroxylapatit wird durch keramisches Brennen von Pentacalciumhydroxid-Triphosphatpulver bei 1250°C gewonnen. Außerdem kann zur Herstellung einer Hydroxylapatitkeramik auch ein natürliches Material herangezogen werden, wie

das carbonatische Skelett der Rotalge. Dabei werden nach einem Wasch- und Trocknungsvorgang zunächst die organischen Bestandteile durch Pyrolyse bei einer Temperatur von etwa 700°C entfernt. Dann erfolgt die Umsetzung zu Hydroxylapatit unter Hinzufügung von Phosphatlösung bei erhöhtem Druck und erhöhter Temperatur.

Bei einem weiteren Herstellungsverfahren einer Hydroxylapatitkeramik, ausgehend von dem natürlichen Skelett von Korallen, wird das Calciumcarbonat der Korallen durch hydrothermale Umwandlung in Hydroxylapatit oder eine Mischung aus Hydroxylapatit und weiteren mineralischen Strukturen umgewandelt. Bei dem so entstehenden Material bleibt die koralline Struktur, d. h. insbesondere das interkonnektierende Porensystem der Koralle, erhalten.

Aluminiumoxidkeramiken, die polykristallin aufgebaut sind, enthalten zu etwa 99,7 % Aluminiumoxid sowie geringe Anteile an Magnesiumoxid und/oder Zirkonoxid. Sie werden nach Vorverdichtung unter hohem Druck bei Temperaturen von etwa 1500 bis 1800°C zu einem Festkörper gesintert. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung wurden mikroporöse Aluminiumoxidkeramiken verwendet. Auch monokristalline Formen (Saphire) können zur Anwendung kommen.

Als weiteres können sogenannte ionische Polymere als Trägermaterialien verwendet werden, für die die Bezeichnung "Ionomer" gebräuchlich ist und die im folgenden auch hier verwendet wird. Dabei ist z. B. Ionomerzement zu nennen, der durch Reaktion von Glaspulver mit einer Polyalkensäure entsteht. In einer Abwandlung kann dem Glaspulver zusätzlich Calciumcarbonat als Schaumbildner zugesetzt werden. Bei der Reaktion des Glaspulvers und des zugesetzten Calciumcarbonats mit der Polyalkensäure wird CO₂ freigesetzt, was die Porosität bewirkt.

Ionomerzement ist grundsätzlich ein Zweikomponentensystem und entsteht durch die Reaktion eines Glaspulvers (Calcium-, Aluminium-, Fluor-, Silikat-Glas) mit einer Polyalkensäure (hoch-molekulares Mischpolymerisat aus Maleinsäure und Acrylsäure). Der Ablauf der zementbildenden Reaktion wird durch Einwirkung der Polyalkensäure auf die basischen Glaspartikel in Gang gesetzt. Hierbei dient Wasser

als Reaktionsmedium. Neben der Polyalkensäure besteht die flüssige Komponente des Reaktionssystems außerdem aus Weinsäure. Durch den Einsatz dieser Weinsäure wird die Abbindegeschwindigkeit des Zementes gesteuert.

5 Ionomerzement gilt als gewebeverträglich und ist im biologischen Milieu dauerhaft stabil. Er ist außerdem plastisch formbar. Der für die Zwecke der vorliegenden Erfindung verwendete Ionomerzement ist frei von Beimengungen in Form von Pigmenten, Farbstoffen oder Metallsalzen. Er ist außerdem frei von monomeren, ungesättigten Carbonsäuren, wie z. B. Acryl- und Maleinsäure und wird steril und
10 pyrogenfrei verwendet.

Unter den metallischen Trägermaterialien ist vor allen Dingen Titan, auch in Form von Legierungen, zu nennen. Dabei wurde insbesondere eine Legierung aus den Komponenten Titan, Aluminium und Vanadin untersucht. Die metallischen Träger
15 können in Form von Plättchen, welche außerdem Gitterstruktur aufweisen können, aber auch in Form von zylindrischen Hohlkörpern mit Gitterstruktur eingesetzt werden.

Weitere metallische Trägermaterialien stehen in Form von Endoprothesen zur
20 Verfügung, bei welchen durch Beschichtung und/oder Befüllen mit dem Wirkstoffkomplex ein schnelleres und dauerhaftes Einwachsen der Endoprothesen im Organismus ermöglicht werden soll.

Die Endoprothesen bilden daher eine besondere Form des erfindungsgemäßen Trägers. Durch ein beschleunigtes Einwachsen an der implantierten Stelle und gleichzeitig ein verbessertes Einwachsen desselben kann wiederum eine längere Haltbarkeit und größere sowie zeitliche frühere Belastbarkeit der Endoprothese resultieren.
25

30 Als nichtmetallisches Trägermaterial ist vor allen Dingen Kohlenstoff zu nennen, der in Form sogenannter "Carbonkäfige" eingesetzt werden kann, welche zylindrische Hohlkörper bilden. Sowohl die Titan (Hohl) Körper als auch die Carbonkäfige

werden mit dem Wirkstoffkomplex befüllt, während die in Plättchen- oder Granulatform vorliegenden sonstigen Trägermaterialien in der Regel mit dem Wirkstoffkomplex beschichtet werden.

5 Die genannten Titanhohlkörper und Carbonkäfige können, wenn sie mit dem Wirkstoffkomplex befüllt worden sind, zur Herstellung, Wiederherstellung oder Stabilisierung von Wirbelkörpern verwendet werden. Damit ergibt sich die einzigartige Möglichkeit, Defekte an Wirbeln oder zerstörte Wirbel der Wirbelsäule wiederherzustellen. Mit dem bisherigen Wirkstoffkomplex war dies deshalb nicht möglich,
10 weil dieser der mechanischen Belastung innerhalb der Wirbelsäule nicht Stand gehalten hätte. Die nun mit dem Wirkstoffkomplex befüllten Hohlkörper oder Käfige schaffen die mechanische Stabilität, ohne jedoch immunologische Gegenreaktionen oder eine verschlechterte Wirksamkeit des Wirkstoffkomplexes nach sich zu ziehen.

15 Außerdem kann das erfindungsgemäße Mittel zur Behandlung von Osteoporose, von Pseudoarthrosen und Knochendefekten, zur Auffüllung großer Knochendefekte und zur Einheilung von Endoprothesen verwendet werden.

Bei den Knochendefekten, die mit dem erfindungsgemäßen Mittel erfolgreich behandelt wurden, gehören z. B. die Gehörknöchelchenkette, der Wiederaufbau der
20 Stirnhöhle, des Siebbeindaches und die Verwendung als Dentalimplantat.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen näher erläutert.

25

I. Herstellung des Wirkstoffkomplexes

Im folgenden werden die wesentlichen Herstellungsschritte des Wirkstoffkomplexes beschrieben:

30 Röhrenknochen von Kälbern, Schafen, Kaninchen oder Ratten wurden gesäubert und unter anderem vom Knochenmark befreit und dann eingefroren. Der gefrorene Knochen wird auf eine Partikelgröße von weniger als 2 mm zerkleinert. Die zer-

kleinerten Knochenstücke wurden in Aceton entfettet und in 0.6 N Salzsäure entkalkt. Danach wird lyophilisiert und man erhält eine demineralisierte Knochenmatrix, die in 4 molarer Guanidinium-HCl-Lösung extrahiert wird. Die Extraktionslösung wird gegen Aqua dest. dialysiert und der Wirkstoffkomplex durch Abzentrifugieren und Lyophilisieren im Präzipitat erhalten.

Diese grundsätzliche Herstellungsweise ist im nachfolgenden Flußdiagramm nochmals dargestellt.

Abb.1: Flußdiagramm zur Herstellung des Wirkstoffkomplexes

Schlachtfrische Röhrenknochendiaphysen

Mahlen auf Partikelgröße (< 2 mm)

Entfetten in Aceton

Entkalken in 0,6 N HCl

Waschen und Lyophilisieren

Demineralisierte Knochenmatrix

Extraktion in 4 M GuHCl

Rückstand

Überstand

Dialyse gegen Aqua destillata

Präzipitat: enthält Wirkstoffkomplex

II. Wirksamkeit des Wirkstoffkomplexes ohne Verwendung von Trägermaterialien

Um zu zeigen, daß der Wirkstoffkomplex als solches wirksam ist, wird zunächst ein Versuch dargestellt, bei dem der Wirkstoffkomplex ohne weitere Trägermaterialien implantiert wird.

1. Für den Versuch verwendete Tiere

Es werden weibliche Kaninchen der Rasse Chinchilla mit einem mittleren Körpergewicht von 3089 g verwendet. Sie erhielten Haltungsfutter für Kaninchen und mit Salzsäure auf pH 4,5 angesäuertes doppelt ozoniertes Leitungswasser nach Bedarf.

Die Tiere wurden durch Subcutaninjektion eines Gemisches von Ketamin und Xylazin narkotisiert.

2. Vorbereitung eines Knochendefektes bei den Kaninchen

Mit einem innen gekühlten Bohrer wurde ein Implantatlager von 4 mm Durchmesser und circa 9 mm Tiefe im Kniegelenk (distales Femurende) des Kaninchens präpariert. Dann wurde das so gebildete Bohrloch jeweils mit 30 und 90 mg des Wirkstoffkomplexes gefüllt, der hergestellt worden war, wie unter I. beschrieben. Jeweils ein weiteres Bohrloch diente in Form eines "Leerloches" zur Kontrolle der Knochenneubildung.

Figur 1 zeigt die Knochenneubildung im Leerloch und im Bohrloch nach Implantation des Wirkstoffkomplexes sowie die Dichte der umgebenden präexistenten Spongiosa jeweils 28 Tage nach der Operation (n=2/Wirkstoff-Menge).

Bei der Auswertung der Versuche wurde festgestellt, daß die Dichte der die Bohrlöcher umgebenden Spongiosa nach Implantation von 30 mg des Wirkstoffkomplexes um 45 % und nach Implantation von 90 mg des Wirkstoffkomplexes um 69 % höher lag als beim Leerloch. Dabei hatte die Menge an präexistenter Spongiosa keinerlei Einfluß auf die Regeneration im Defekt, da die Knochenneubildung

bildung nach der Insertion des Wirkstoffkomplexes nicht von der Bohrlochperipherie ausging, sondern gleichmäßig über den Defekt verteilt war.

III. Knochenbildung im Unterkiefer von Schafen unter Verwendung von Tricalciumphosphat (TCP)

1. Für die Versuche verwendete Tiere

Für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden ausgewachsene Hausschafe von der Viehzentrale Südwest AG Stuttgart verwendet. Diese erhielten Heu und Wasser als Ernährung sowie drei Tage vor dem operativen Eingriff einen Brei aus Altromin-Pellets.

Die Tiere wurden mit 1 ml Xylazin/1ml Ketanest i. m. prämediziert. Dann wurden die Schafe mit Nembutal narkotisiert.

2. Vorbereitung des Implantats

TCP wurde in einer Lösung von 100 mg gelöstem Wirkstoffkomplex mit 10 ml Wasser suspendiert und unter ständigem Rühren mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach 24-stündigem Lyophilisieren und anschließender Gassterilisation (Ethylenoxid) wurde das so mit dem Wirkstoffkomplex dotierte TCP in den nachfolgend beschriebenen Unterkiefer-Defekt eines Schafes eingebracht. Außerdem wurde ein weiterer Unterkiefer-Defekt, der als Vergleich diente, mit undotiertem, im Autoclaven sterilisiertem TCP gefüllt.

3. Vorbereitung des Unterkiefer-Defektes beim Schaf

In einem entsprechend vorbereiteten Unterkiefer eines Schafes wurde unter Kühlung mit physiologischer Kochsalzlösung mittels eines Trepanbohrers von 5 mm Durchmesser jeweils ein normierter Knochenzylinder herausgefräst und entfernt. Dann wurde eines der so gebildeten Bohrlöcher mit TCP, das gemäß der Versuchsvorschrift 1. mit dem Wirkstoffkomplex dotiert worden war, befüllt und das zweite Bohrloch mit undotiertem TCP aufgefüllt.

Die Ergebnisse des Knochenwachstums in den Unterkieferdefekten sind in Fig. 2 zur Erleichterung der Übersicht grafisch dargestellt. Die Versuchsdauer betrug 26 bzw. 41 Tage.

5 Es zeigte sich, daß durch die Dotierung von TCP mit dem Wirkstoffkomplex eine Beschleunigung der knöchernen Regeneration des Unterkieferdefektes der beiden Schafe Nr. 811 und 86 in der Anfangsphase von etwa 100 % erreicht wurde. Nach 41 Tagen betrug die Steigerung der Beschleunigung der knöchernen Regeneration immer noch 10 %. Die Knochenheilung verläuft daher besonders am Beginn deut-
10 lich schneller als ohne die osteoproduktive Wirkung der mit dem Wirkstoffkomplex dotierten Implantate.

Diese Erkenntnis ist insbesondere für die Beschichtung von Endoprothesen mit dem Wirkstoffkomplex von Bedeutung. Eine mit dem Wirkstoffkomplex be-
15 schichtete Endoprothese, beispielsweise im Fall eines Oberschenkelhals-Bruches, ermöglicht entsprechend ein schnelleres Einwachsen der Prothese und damit eine schnellere Regeneration und Rekonvaleszenz des jeweiligen Patienten. Dadurch wird die Dauer des Krankenhausaufenthaltes verkürzt.

20 IV. Versuche mit Collagenen als Trägermaterialien

Der bereits bekannte, weiter oben erläuterte Wirkstoffkomplex kann zur Behand-
lung der Osteoporose, von Pseudoarthrosen, der Einheilung von Endoprothesen und zur Auffüllung großer Knochendefekte verwendet werden. Bei der Herstellung des Wirkstoffkomplexes ist der mengenmäßige Ertrag in dem erforderlichen Rein-
25 heitsgrad sehr gering. Daher wurde untersucht, ob es Trägermaterialien gibt, die mit dem Wirkstoffkomplex kombiniert werden können, um so die Menge des für die jeweilige Zielsetzung benötigten Wirkstoffkomplexes reduzieren zu können, ohne dadurch seine knochenbildende Wirksamkeit zu verringern.

1. Wirkstoffkomplex

Der für die Zwecke der nachfolgend beschriebenen Versuche verwendete Wirkstoffkomplex wurde genauso hergestellt wie unter I. beschrieben, wobei Röhrenknochen von Kälbern verwendet wurden.

2. Versuchstiere

Es wurden männliche Wistarratten eines Gewichtes zwischen 350 und 400 g verwendet und in einem klimatisierten Tierstall bei 23° C und etwa 50 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Ernährt wurden sie mit einer Haltungsdiät für Ratten und Mäuse.

Jedem untersuchten Tier wurden zwei Implantate desselben Trägermaterials in die Bauchmuskulatur eingebracht, von denen eins mit dem Wirkstoffkomplex beschichtet war, während das andere als Vergleichsimplantat unbeschichtet blieb. Die Tiere wurden nach 21 Tagen getötet und die betreffenden Areale der Implantate in der Bauchmuskulatur explantiert und histologisch ausgewertet.

3. Verwendete Trägermaterialien

Für diese Versuche wurden Collagenmaterialien eingesetzt, die alle käuflich zu erwerben sind. Collagen A war ein reines, steriles, natives, resorbierbares Rinderhautcollagen, das frei ist von jeglichen Fremdzusätzen, wie Stabilisatoren oder Desinfizienzien.

Collagen B war ein gereinigtes, lyophilisiertes, leicht quervernetztes steriles und nicht pyrogenes Rinderhautcollagen mit schwachen antigenen Eigenschaften. Die helikale Struktur des Collagens blieb erhalten.

Collagen C bestand aus reinen, nativen und resorbierbaren Rindercollagenfibrillen.

Alle verwendeten Collagene lagen in Vliesform vor. Es wurden Collagenvliesstücke von je 50 mg abgeschnitten und je 1 ml der Wirkstoffkomplex-Lösung (3mg/ml) zugegeben. Bei den Kontrollimplantaten wurde stattdessen 1 ml destillierten Wasser zugegeben. Die so behandelten Collagenvliesstücke wurden bei -20° C eingefroren, lyophilisiert und ergaben Implantate mit einem Durchmesser von etwa 10

mm und einer Dicke von etwa 5 mm. Fig. 3 zeigt die Ergebnisse der Knochenbildung der Collagenimplantate A, B und C in mit und ohne Beschichtung mit dem Wirkstoffkomplex (Cyclosporin A) immunsupprimierten Tieren als auch nicht immunsupprimierten Tieren nach 21 Tagen. Dabei entspricht die Bewertungszahl (BZ) dem arithmetischen Mittel der Bewertungszahlen von drei unabhängigen Personen bei sechs Implantaten jeder Gruppe.

Mit dem Wirkstoffkomplex beschichtetes Collagen A zeigte nach dieser Zeit bei immunsupprimierten Tieren einen knochenbildenden Effekt, während dieser bei Collagen B nicht nachgewiesen werden konnte. Demgegenüber zeigte jedoch Collagen C einen sehr ausgeprägten knochenbildenden Effekt.

IV. Prüfung von Trägermaterialien auf ihre Biokompatibilität

In Versuchen, die die Verbesserung der Langzeitstabilität von Endoprothesen betrafen, wurden Titanplättchen mit unterschiedlicher Rauigkeit (100, 20 und 0,5 μm), eine TiAl₆V₄-Legierung (0,5 μm) und Al₂O₃ Plättchen der Firma Friedrichsfeld sowie Hydroxylapatit-Plättchen von der Feldmühle AG eingesetzt.

Die Beschichtungen mit dem Wirkstoffkomplex, welcher nach dem weiter oben angegebenen allgemeinen Verfahrensschema hergestellt worden war, wurden durch das Beschichtungsverfahren "Dip-coating" aufgebracht. Unter "Dip-coating" wird ein Beschichtungsverfahren verstanden, bei dem der zu beschichtende Gegenstand, hier die Plättchen, in eine Lösung mit einer gewünschten, vorgegebenen Konzentration des Beschichtungsmittels, hier des Wirkstoffkomplexes, getaucht wird. Anschließend wird lyophilisiert. Es werden dünne Überzugsschichten bzw. Beschichtungen erhalten. Die Prüfung der angegebenen Materialien auf ihre Biokompatibilität wurde insbesondere in Bezug auf die Rauigkeit der Oberflächen durchgeführt (n=20; je vier Plättchen).

Tabelle 1:

Trägermaterial	Anzahl lebender Zellen/cm ²	Anzahl toter Zellen/cm ²
Hydroxylapatit		
0,2 - 0,5 µm	1792 ± 700	200 ± 37
20 µm	7469 ± 2614	2238 ± 715
50 µm	4477 ± 408	1692 ± 427
Osprovit (Feldmühle)	7930 ± 2007	1638 ± 377
Titan		
0,5 µm	11377 ± 2538	1054 ± 308
20 µm	9600 ± 3038	1754 ± 439
100 µm	2308 ± 669	2085 ± 623
TiAl ₆ V ₄		
0,5 µm	7200 ± 1062	2800 ± 954
Al ₂ O ₃ reinst, poliert	11446 ± 1500	2292 ± 600

Bei dieser Biokompatibilitätsprüfung der untersuchten Materialien zeigte sich, daß Titan aufgrund der höchsten Anzahl lebender Zellen sowie den besten Verhältnis lebender : toter Zellen als Trägermaterial sehr geeignet ist. Während Hydroxylapatit ein ähnlich gutes Ergebnis lieferte schnitt TiAl₆V₄ erheblich schlechter ab.

Generell zeigte sich in Bezug auf die Oberflächenrauigkeiten, daß die glattesten Oberflächen (0,2 - 0,5 µm), mit Ausnahme von TiAl₆V₄, die besten Resultate lieferten. Mit Zunahme der Rauigkeit sinken sowohl die Anzahl lebender Zellen als auch das Verhältnis lebender : toter Zellen.

Die Ergebnisse dieser Versuche konnten nun auf die Beschichtung von Endoprothesen mit dem Wirkstoffkomplex, aber auch auf die Beschichtung formstabiler Käfige übertragen werden.

Vor dem Einsetzen der jeweiligen Endoprothesen wurden diese nach dem Verfahren das "Dip-coatings" mit dem Wirkstoffkomplex beschichtet und zusätzlich wur-

de der Wirkstoffkomplex in die inneren Hohlräume des jeweiligen Prothesenschaftes, die Austritte an die Schaftoberfläche haben, eingeführt. Dadurch ergibt sich für zukünftige mögliche Lockerungen der Endoprothesen der Vorteil, daß nachträglich der Wirkstoffkomplex ohne einen größeren Eingriff aufgebracht werden kann und dort zu einer Knochenbildung und damit Verfestigung der Endoprothese führt.

Das die Beschichtung mit dem Wirkstoffkomplex zu höheren Belastungsmöglichkeiten, im Vergleich zu nicht beschichteten Oberflächen führt, zeigt Tabelle 2 am Beispiel von Hydroxylapatit (HA). Dabei wurden die Zugfestigkeiten an der Grenzfläche verschiedener Implantatmaterialien in $\text{N/mm}^2 \pm$ Standardabweichung bestimmt. Als Material wurde mittels heiß isostatischem Pressen (HIP) hergestellter Hydroxylapatit gegenüber zusätzlich mit dem Wirkstoffkomplex beschichtetem Hydroxylapatit bestimmt. Das Implantatmaterial wurde in das distale Kaninchenfemur implantiert und nach 84 Tagen untersucht. Die dabei aufgefundenen Zugfestigkeiten sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben.

Tabelle 2

Material	RT (μm)	Tage	n	Zugfestigkeit
HA HIP	0,5	84	10	$1,53 \pm 0,24$
HA HIP WK	0,5	84	6	$2,27 \pm 0,31$

n= Anzahl der Implantate

WK= Beschichtung mit dem Wirkstoffkomplex

HIP= heiß isostatisches Pressen

RT= Oberflächenrauigkeit

V. Titankörper und Carbonkäfige

Nachdem die unter IV. dargestellten Untersuchungen die grundsätzliche Biokompatibilität des Titans nachwiesen, ergab sich eine besondere Anwendungsmöglichkeit des Wirkstoffkomplexes in formstabilen Käfigen aus Titan zur Verblockung von Wirbelkörpern. Außerdem zeigten sich hierfür auch Kohlenstoffkäfige, so-

nannte "carbon cages" als geeignet. Eine Verblockung von Wirbelkörpern ist häufig erforderlich, wenn durch degenerative Prozesse an den Bandscheiben, Tumoren oder Metastasen in den Wirbelkörpern der Wirbelsäule oder auch durch Osteoporose die Tragfähigkeit der Wirbelsäule beeinträchtigt ist, so daß entweder Wirbelfrakturen oder Nervenläsionen drohen. In diesen Fällen ist es erforderlich, die Kontinuität der Wirbelsäule über ein mechanisch stabiles Implantat, wie den Titankörper oder Kohlenstoffkäfig zu sichern. Die erforderliche knöcherne Überbrückung konnte bislang nur durch in einem Zweiteingriff gewonnene autologe Spongiosa versucht werden, was eine Reihe von Problemen beinhaltet, wie z. B. den Zweiteingriff und das damit verbundene Operationsrisiko, die begrenzte Menge an gewinnbarer Spongiosa, Komplikationen an der Entnahmestelle, wie Infektionen oder chronische Schmerzzustände.

Durch die Befüllung der Titankörper oder Kohlenstoff-Käfige mit dem Wirkstoffkomplex konnte in kurzer Zeit eine knöcherne Überbrückung gesichert werden, ohne autologe Spongiosa zu benötigen. Dabei sind sowohl der Titankörper als auch der Carbon-Käfig als Hohlkörper mit Gitterstruktur aufgebaut. Diese Gitterstruktur erlaubt eine rasche Vaskularisierung auch im Inneren der formstabilen Komponente, so daß der Wirkstoffkomplex seine Aktivität entfalten kann und die Knochenbildung über das gesamte erforderliche Volumen eintritt, ohne das mechanische Kräfte die Form des neugebildeten Knochens beeinträchtigen. Neben der Verwendung im Bereich der Wirbelkörper kann ein solcher Titankörper oder Kohlenstoff-Käfig auch an beliebigen anderen Implantationsorten verwendet werden, wie z. B. im Kiefer und an Röhrenknochen.

Ein mit dem Wirkstoffkomplex befüllter Titankörper ist in Fig. 4 dargestellt.

tms/03.04/P

16. April 1999/De

Patentansprüche

- 5 1. Mittel für die zumindest teilweise Herstellung oder Wiederherstellung von biologischen Teilen, insbesondere von Organen für Lebewesen, bei dem ein Träger mit einem Wirkstoffkomplex beschichtet ist oder einen Wirkstoffkomplex aufweist und dieser Wirkstoffkomplex die folgenden, voneinander unterschiedlichen und auf das jeweils herzustellende biologische
- 10 Teil spezifisch abgestimmten Komponenten in Form mindestens einer Strukturkomponente auf der Basis von auf die Zellen des jeweils herzustellenden biologischen Teils spezifisch abgestimmtem extrazellulärem Material, mindestens einer Rekrutierungskomponente, mindestens einer Adhäsionskomponente und mindestens einer Wachstums- und/oder
- 15 Maturationskomponente, aufweist.
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger aus polymeren, keramischen, metallischen oder nichtmetallischen Trägermaterialien besteht.
- 20 3. Mittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die polymeren oder keramischen Trägermaterialien ausgewählt sind aus Hydroxylapatit-, Calciumphosphat-, Aluminiumoxid- und Polylaktatmaterialien sowie Ionomerzement.
- 25 4. Mittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das metallische Trägermaterial ausgewählt ist aus Titan oder einer Titan-Legierung.
- 30 5. Mittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das nichtmetallische Trägermaterial ausgewählt ist aus Kohlenstoff.

6. Verwendung des Mittels gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Herstellung, Wiederherstellung oder Stabilisierung von Wirbelkörpern
- 5 7. Verwendung des Mittels gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Behandlung von Osteoporose, von Pseudoarthrosen und Knochendefekten, zur Auffüllung großer Knochendefekte und zur Einheilung von Endoprothesen.

Fig. 1

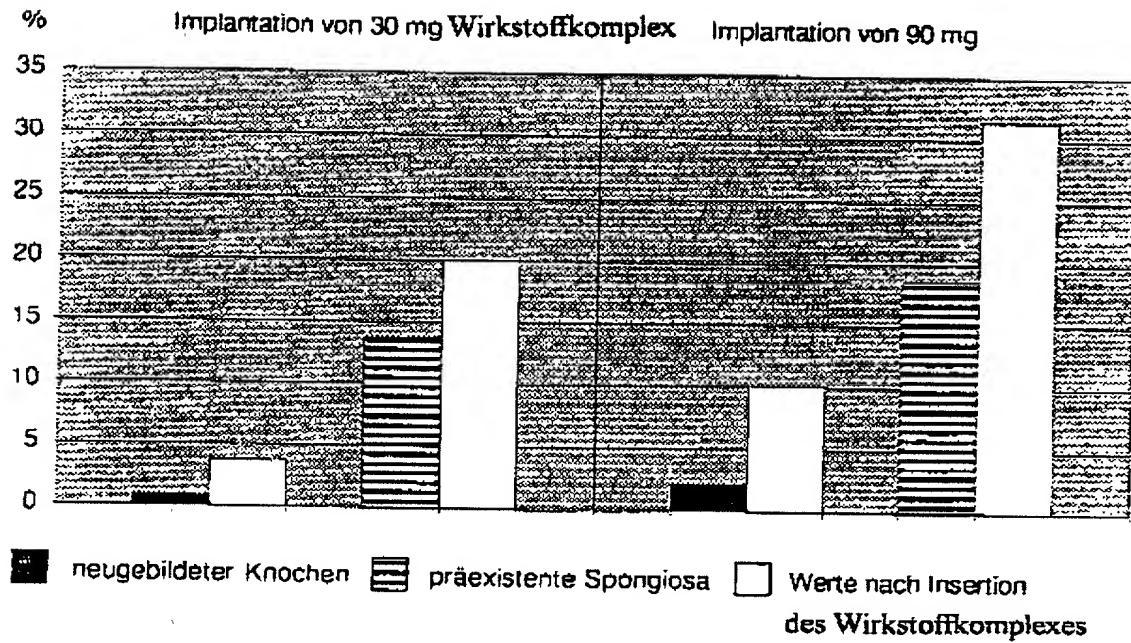
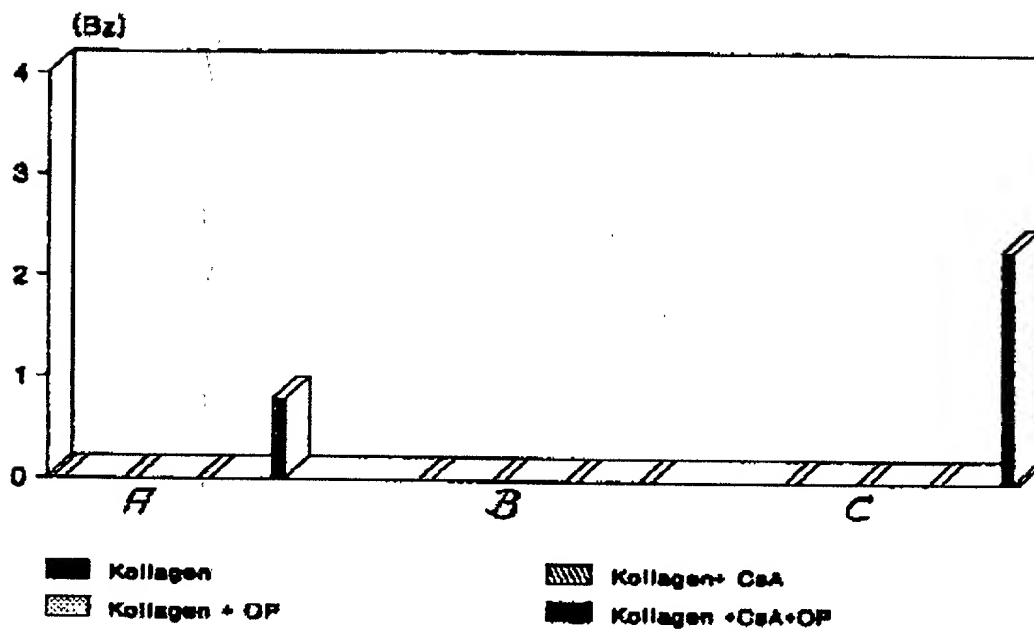


Fig. 3



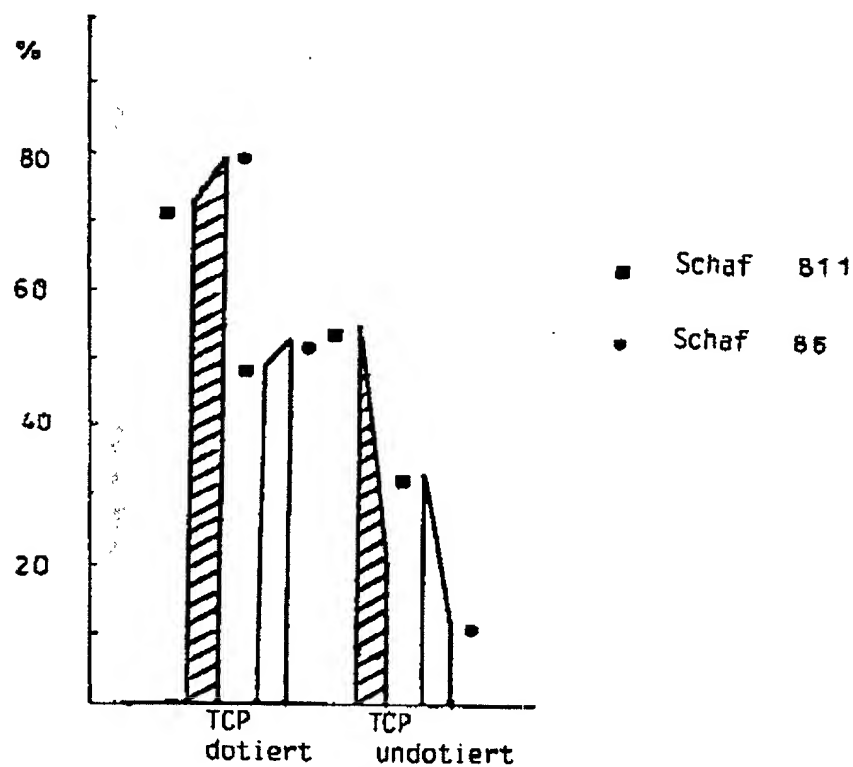
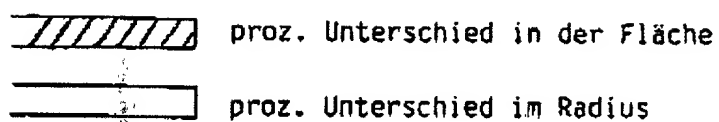


Fig. 4



tms/03.04/P

16. April 1999/De

Zusammenfassung

5 Die Erfindung betrifft ein Mittel für die zumindest teilweise Herstellung oder Wiederherstellung von biologischen Teilen, insbesondere von Organen für Lebewesen, bei dem ein Träger mit einem Wirkstoffkomplex beschichtet ist oder einen Wirkstoffkomplex aufweist und dieser Wirkstoffkomplex die folgenden, voneinander unterschiedlichen und auf das jeweils herzustellende biologische Teil

10 spezifisch abgestimmten Komponenten in Form mindestens einer Strukturkomponente auf der Basis von auf die Zellen des jeweils herzustellenden biologischen Teils spezifisch abgestimmtem extrazellulärem Material, mindestens einer Rekrutierungskomponente, mindestens einer Adhäsionskomponente und mindestens einer Wachstums- und/oder Maturationskomponente, aufweist.

15

Das erfindungsgemäße Mittel kann zur Herstellung, Wiederherstellung oder Stabilisierung von Wirbelkörpern, zur Behandlung von Osteoporose, von Pseudoarthrosen und Knochendefekten, zur Auffüllung großer Knochendefekte und zur Einheilung von Endoprothesen verwendet werden.